

# 抗ハプテン抗体産生に関する研究

## —ハプテンを異にする複合体投与の影響—

金沢大学がん研究所免疫生物部 (主任: 高橋守信教授)

吉 田 文 直

(昭和56年7月13日受付)

**Key words** carrier effect, 7S  $\gamma_2$  antibody, p-aminobenzoic acid azo-BGG, atoxyl azo-BGG, sulfanilic acid azo-BGG

ハプテンが担体と結合して初めて免疫原となる事実、更に二次抗ハプテン応答は同一ハプテン異担体複合体によってほとんど惹起されないが、同一複合体を用いると強く認められる事実は、抗ハプテン応答に担体が大きく関与していることを示唆している。

Katz<sup>1)2)</sup>らはハプテン担体複合体の投与に先行して担体を Freund's complete adjuvant (FCA) 法で投与しておくとして二次抗ハプテン応答の促進増強のみられるのを観察して、担体のこのような作用を担体効果と呼んだ。

また担体を FCA 法で投与した Allogenic-donor モルモットからのリンパ球様細胞を他動移行し、更に、ハプテン同一担体で感作したモルモットでは抗ハプテン応答が増幅されるという知見をえて、移行細胞中に recipient の抗ハプテン抗体産生細胞と協同作業を行う細胞があることを強く示唆した。こうして抗ハプテン応答には担体を認識する T-細胞の協力を必要とすることが明らかにされるに至った。

ところで教室においては数年来ハプテン—担体複合体投与後の抗ハプテン抗体応答に及ぼす諸条件の影響について研究の歩を進めてきたが、そのなかで Bovine serum albumin (BSA) in FCA 前投与は p-Aminobenzoic acid azo-BSA (PABA-BSA) 追加投与後の一次抗 PABA 応答を促進増強させる (担体効果) が、更に Atoxyl azo-BSA in FCA 前投与は PABA-BSA 追加投与後、二次応答に比肩しうる抗 PABA 応答を惹起させるという興味ある重要な知見をえた。<sup>3)</sup>よ

って担体効果に関する知見の深化拡大を図るとともに前投与と追加投与にハプテンを異にする複合体を用いた場合の抗ハプテン免疫応答について検索を加え、抗ハプテン抗体産生機序解明への接近を試みた。

### 材料ならびに方法

#### I 実験材料

1 動物: 一定期間一定条件下で飼育したモルモットで体重約 400 g のものを用いた。

#### 2 抗原

1) 注射用抗原

i) Bovine  $\gamma$ -globulin (BGG): NBC 製 BGG Fraction II を用いた。

ii) p-Aminobenzoic acid azo-BGG (PABA-BGG): p-Aminobenzoic acid (PABA) 1.26 g に IN-HCl 21 ml および純水 27 ml を加え、加温溶解後氷冷 (0 ~ 2°C) した。これに IN-NaNO<sub>2</sub> を約 9.2 ml 徐々に滴下し (沃化カリウムでん粉紙を青変しない程度)、引き続きかく拌して 0 ~ 2°C に約 10 分間保ち、次いで 2 N-NaOH で pH 7.0 ~ 7.5 に修正し、更に冷純水を加えて全量を 100 ml とした。これを 2% BGG 溶液 (0.2 MPB, pH 9.5) 100 ml に加え、かく拌しながら一夜氷室に放置した。翌朝、飽和硫酸を等量加え、IN-HCl で pH 4.0 とし、4,000 rpm, 20 分間遠心、その沈澱を冷純水と 2 N-NaOH で溶解し、ろ過して不溶物を除いた。この操作を更に 2 回繰り返した後、純水で 1 週間透析し、凍結乾燥した。

Effect of Treatment with Hapten-Carrier Conjugate on Production of Antibody to Different Hapten Coupled to the Same Carrier. **Fuminao Yoshida**, Department of Immunobiology (Director: Prof. M. Takahashi), Cancer Research Institute, Kanazawa University.

iii) Atoxyl azo-BGG (At-BGG) および Sulfanilic acid azo-BGG (Sul-BGG): PABA-BGG に準じて作製した。

iv) o-Aminophenol azo-BGG (OA-BGG): o-Aminophenol, 8.0 g を IN-HCl, 220 ml に溶解し、これに 10% (W/V) NaNO<sub>2</sub> 溶液を氷冷下 (0~2°C) で沃化カリウムでん粉紙を青変しない程度に加え (約 38~40 ml), 更に同量の冷純水を追加し, 15 分間放置した。こうしてえられたジアゾニウム塩を 0.5% BGG 500 ml と 1 N-NaOH 175 ml の混合液に加え, かく拌しながら一夜氷室に放置した。その後 5,000 rpm, 10 分間遠心, ろ過し蒸留水で 2 日間透析して凍結乾燥した。

v) Aniline azo-BGG (An-BGG): 蒸留水 25 ml に 2.35 g のアニリンを加え, 更に濃塩酸 5.5 ml を追加した。この中に蒸留水で作った砕氷を入れて冷やしながら, NaNO<sub>2</sub> 蒸留水溶液 (2 g を 5 ml に溶解) を徐々に沃化カリウムでん粉紙を青変しない程度に加え, 次いで 1 N-NaOH で中和後, 水中で 30 分間かく拌した。これを 1% BGG (0.01 M borate buffer pH 9.5) 100 ml に加え, 1 N-NaOH で pH 9.0 とし, 2 時間氷水中でかく拌した後, 蒸留水中で 1 週間程透析して凍結乾燥した。

vi) Dinitrophenylated BGG (DNP-BGG) Eisen ら<sup>4)</sup>の方法に準じて作製した。

2) 反応用抗原: Human  $\gamma$ -globulin (HGG) — NBC 製  $\gamma$ -globulin Fraction II — を担体として, 注射用抗原作製法に準じて, PABA-HGG, At-HGG, Sul-HGG および DNP-HGG を作製した。

## II 実験方法

### 1 抗原投与法

食塩水溶液 (S) 法, Alum 沈降法, Freund incomplete adjuvan (FIA) 法, あるいは Freund complete adjuvant (FCA) 法によった。動物 1 匹当りの抗原量は S 法の場合 1 mg, その他の場合では 0.1 mg とした。抗原の Adjuvant 法による投与は越沢<sup>5,6)</sup>の方法に準じて行った。

### 2 遅延型皮膚反応 (DHS) および角膜反応 (CR)

それぞれ越沢<sup>9)</sup>および Raffel<sup>7)</sup>の方法に準じた。

### 3 抗体価測定

#### 1) 感作血球凝集反応 (PHA)

#### 2) 感作血球溶血反応 (PHL)

#### 3) 受身皮膚アナフィラキシー反応 (PCA)

いずれも越沢<sup>9)</sup>の方法に準じて行った。

なおそれぞれの反応で検出される抗体を PHA 抗体, PHL 抗体および PCA 抗体と略記する。

また本文中単に抗体とある場合は PHL 抗体を示すものとする。

### 4) Sephadex G-200 ゲルろ過および Zone

electrophoresis

いずれも山端<sup>8)</sup>の方法に準じて行った。

### 5) マクロファージ遊走阻止試験

George ら<sup>9)</sup>の方法に準じて行った。

## 成 績

I PABA-BGG 投与後の免疫応答について PABA-BGG in FCA, PABA-BGG in FIA, PABA-BGG in Alum および PABA-BGG in S を投与されたそれぞれのモルモット群の免疫応答を総合的に比較検討し, その結果の概要を表 1 に示した。

ここで再確認された興味ある知見は, まず PHA は全群において陽性であること, PHL は前 3 群で陽性であるが後 1 群では陰性であること, 次いで DHS の発現は前 2 群では認められるが, 後 2 群ではみとめられないことである。なお PABA-BGG in FIA 投与群における DHS は一過性で CR 陰性である。

更に各群の抗血清について Sephadex G-200 ゲルろ過を行って検討すると, PHA 活性は最初第 1 峰部に, 遅れて第 2 峰部に認められるに至り, 最終的には第 2 峰部がその主な存在域となる。PCA 活性と PHL 活性は第 2 峰部にのみ存在し, 第 2 峰部 PHA 活性とほぼ同時期にその出現が認められる。

また, Sephadex G-200 ゲルろ過第 2 峰分画を分電泳動法にかけてみると, Slow migrating component と Fast migrating component との移動度の異なる 2 部分に分かれ, 前者 (7 S<sub>72</sub>) が PHL 活性, 後者 (7 S<sub>71</sub>) が PCA 活性を示す。

すなわち, PABA-BGG のいずれの投与方法によっても抗 PABA 抗体のうち, まず 19S 抗体, 次いで 7S 抗体が産生されるが, PABA-BGG in S 投与では 7 S<sub>72</sub> 抗体産生のみられないこと, また 7 S<sub>72</sub> 抗体産生のみられる PABA-BGG in Alum 投与群で DHS 発現の観察されないことは明らかで興味あるところである。

これらの予備実験から主として 7 S<sub>72</sub> 抗体産生を指標として抗体産生の有無, 促進増強などを検討した。したがって既に記載したごとく, 以下単に抗体と記載されている時は PHL 抗体を示している。

## II A BGG in FCA 前投与の効果

### 1 PABA-BGG in S 追加投与動物における抗 PABA 抗体の産生について

BGG in FCA をまず投与し, 7, 14, 21, あるいは 28 日後に PABA-BGG in S を同一領域内に追加投与し, 追加投与後それぞれ 7, 10, 14 および 21 日後に採取した抗血清について抗 PABA 抗体価を調べた。表 2 はその成績を要約したものである。これで見ると, PABA-BGG in S 単独投与群では実証されない抗

Table 1. Effect of adjuvants on production of anti-hapten antibodies and on development of delayed hypersensitivity

Antigen	Adjuvants	Anti-PABA <sup>1)</sup> PHA <sup>2)</sup> titer on day				Anti-PABA PHL <sup>3)</sup> titer on day				PCA <sup>4)</sup> on day	DHS <sup>5)</sup> on day		CR <sup>6)</sup> on day
		7	14	21	28	7	14	21	28	14	7	14	14
PABA-BGG <sup>7)</sup> in	S <sup>8)</sup>	0	5* (4.0)	5 (4.6)	5 (5.0)	0	0	0	0	5 (4.0)	0	0	—***
	Alum	5 (3.8)	5 (4.2)	5 (5.0)	5 (6.0)	0	5 (4.2)	5 (4.4)	5 (4.2)	5 (6.0)	0	0	—
	FIA <sup>9)</sup>	5 (4.0)	5 (4.4)	5 (6.0)	5 (6.0)	0	5 (4.2)	5 (5.4)	5 (5.0)	5 (6.0)	5** (1.4)	2 (0.5)	—
	FCA <sup>10)</sup>	5 (4.0)	5 (6.0)	5 (6.0)	5 (7.0)	0	5 (5.2)	5 (6.0)	5 (5.2)	5 (7.0)	5 (2.2)	5 (2.4)	+

Note: 1) PABA: p-Aminobenzoic acid  
 2) PHA: Passive hemagglutination  
 3) PHL: Passive hemolysis  
 4) PCA: Passive cutaneous anaphylaxis  
 5) DHS: Delayed hypersensitivity  
 6) CR: Corneal reaction  
 7) PABA-BGG: PABA azo-bovine  $\gamma$ -globulin  
 8) S: Saline  
 9) FIA: Freund's incomplete adjuvant  
 10) FCA: Freund's complete adjuvant

\* No. of animals which showed positive reaction in five animals tested (Mean of antibody titer in positive animals shown by log 2)  
 \*\* No. of animals showing positive reaction in five animals tested (Mean of reaction grade in positive animals)  
 \*\*\* -: negative reaction  
 +: positive reaction

Anti-PABA PHA, Anti-PABA PHL and PCA titers of the sera from guinea pigs immunized with PABA-BGG were measured by using PABA azo-human  $\gamma$ -globulin as antigen, while in observation of development of DHS and CR, the immunizing antigen was used as challenge antigen.

PABA 抗体が, BGG in FCA をまず投与し, その 7, あるいは 14 日後に PABA-BGG in S を追加投与した群では認められるものがある。しかし同じ表 2 に示されているように単に FCA を前投与し, 7 あるいは 14 日後に PABA-BGG in S を追加投与しても同程度の抗 PABA 抗体産生が認められる。

このことは, BGG in FCA と FCA の両前投与間には PABA-BGG in S 追加投与後の抗 PABA 抗体産生への効果に差のないことを示しており, いわゆる担体効果は認められなかった。

## 2 PABA-BGG in FIA 追加投与動物における抗 PABA 抗体産生について

さきに BGG in FCA 前投与が PABA-BGG in S 追加投与後の抗 PABA 抗体産生に担体効果を示さないとみられる結果をえたので, ここでは PABA-BGG in S のかわりに PABA-BGG in FIA を追加投与してみた。その成績も表 2 に要約した。これから分かることは, BGG in FCA 前投与を行わないで PABA-BGG in FIA のみを投与した動物に比べ, 両投与を行った動物ではその投与間隔が 7 あるいは 28 日であっても明らかに抗 PABA 抗体産生の促進増強がみられることである。

## II B At-BGG in FCA 前投与の効果

At-BGG in FCA 前投与, PABA-BGG in S あるいは PABA-BGG in FIA 追加投与動物について抗

PABA 抗体産生を検討したところ, きわめて興味ある知見がえられた。その成績も表 2 に要約した。

この表からわかるように, BGG in FCA のかわりに At-BGG in FCA を前投与すると PABA-BGG in S の追加投与によっても試みられたすべての両投与間隔下で抗 PABA 抗体の産生が観察された。しかし両投与間隔間が 7 日の場合最も顕著であって, 14, 21, および 28 日と長くなるに従って漸次抗体産生の低下がみられた。

ここで更に PABA-BGG in S にかえて PABA-BGG in FIA を追加投与すると抗 PABA 抗体の産生は PABA-BGG in S 投与によるよりも更に促進増強され, かつその程度は両投与間隔間が 7 日の場合に比し 28 日の方が大であった。

## III At-BGG 前投与法の影響

これまでの実験で, At-BGG in FCA を前投与しておくとも PABA-BGG in S あるいは PABA-BGG in FIA 追加投与できわめて顕著な抗 PABA 抗体の産生が認められたのでここでは At-BGG を FCA 法以外の Adjuvant 法で前投与し, PABA-BGG in S の追加投与を行ってみた。表 3 はその成績の概要を示したものである。

これとみると, At-BGG in FCA および At-BGG in FIA 前投与群では 21 日後 PABA-BGG in S を追加投与すると両群において共に抗 PABA 抗体産生の認めら

れるものがある。一方 At-BGG in Alum あるいは At-BGG in S 前投与群では 21 日後の PABA-BGG in S 追加投与で抗 PABA 抗体の産生を実証することはできなかった。また At-BGG in Alum 前投与群でも PABA-BGG in S の代りに PABA-BGG in FIA を追加投与すると、両投与間隔が 21 日であると抗 PABA 抗体産生の促進のみられるものがあつたが、42 日間隔となるとほとんど前投与効果を実証できなくなった。

しかしながら At-BGG in FIA 前投与、PABA-BGG in FIA 追加投与群では 42 日間隔でも顕著な抗 PABA 抗体産生が観察され明らかな対比を示している。

なお At-BGG in S 前投与が PABA-BGG in FIA 追加投与後の抗 PABA 抗体産生に影響を与えているとみられる知見はえられなかった。このことは、それ自体単独では抗 PABA 抗体産生を惹起しえない PABA-BGG in S 前投与に PABA-BGG in FIA 追加投与後の抗 PABA 抗体産生を促進増強させる前投与効果の認められることと顕著な対比を示している。

(表略)

#### IV A Sul-BGG in FCA および DNP-BGG in FCA 前投与、PABA-BGG in FIA 追加投与動物における抗 PABA 抗体産生について

Table 2. Effect of priming injection with BGG or At-BGG<sup>1)</sup> in FCA on anti-PABA antibody production following challenge injection with PABA-BGG in saline or PABA-BGG in FIA

Priming injection (P)	Challenge injection (C)	Days between P and C	Anti-PABA PHL titer on day after C			
			7	10	14	21
BGG in FCA	PABA-BGG in S	7	0	0	$\frac{2}{(2.0)}$	$\frac{2}{(2.0)}$
		14	0	0	$\frac{2}{(2.0)}$	$\frac{2}{(2.0)}$
		21	0	0	$\frac{1}{(1.0)}$	0
		28	0	0	0	0
	PABA-BGG in FIA	7	$\frac{2}{(2.0)}$	$\frac{5}{(4.5)}$	$\frac{5}{(4.7)}$	$\frac{5}{(5.8)}$
		28	$\frac{2}{(2.0)}$	$\frac{5}{(4.2)}$	$\frac{5}{(5.6)}$	$\frac{5}{(6.0)}$
		84	0	$\frac{5}{(3.2)}$	$\frac{5}{(4.0)}$	$\frac{5}{(4.8)}$
At-BGG in FCA	PABA-BGG in S	7	$\frac{2}{(2.0)}$	$\frac{5}{(3.0)}$	$\frac{5}{(3.0)}$	$\frac{5}{(3.0)}$
		14	$\frac{1}{(3.0)}$	$\frac{3}{(3.4)}$	$\frac{5}{(3.0)}$	$\frac{5}{(2.6)}$
		21	0	$\frac{2}{(3.0)}$	$\frac{3}{(3.6)}$	$\frac{3}{(3.0)}$
		28	0	$\frac{2}{(2.5)}$	$\frac{2}{(3.5)}$	$\frac{2}{(3.0)}$
	PABA-BGG in FIA	7	$\frac{5}{(3.2)}$	$\frac{5}{(5.0)}$	$\frac{5}{(5.0)}$	$\frac{5}{(5.6)}$
		28	$\frac{5}{(3.0)}$	$\frac{5}{(6.0)}$	$\frac{5}{(7.0)}$	$\frac{5}{(7.0)}$
FCA	PABA-BGG in S	7	0	0	$\frac{2}{(2.0)}$	$\frac{2}{(1.5)}$
		14	0	0	$\frac{1}{(1.0)}$	$\frac{1}{(1.0)}$
		21	0	0	0	0
	PABA-BGG in S	.	0	0	0	0
.	PABA-BGG in FIA	.	0	$\frac{3}{(3.0)}$	$\frac{5}{(4.2)}$	$\frac{5}{(5.0)}$

Note: See Table 1. 1) At-BGG: atoxyl azo-BGG

Table 3. Effect of priming injection with At-BGG in various adjuvants on anti-PABA production following challenge injection with PABA-BGG

Priming injection (P)	Challenge injection (C)	Days between P and C	Anti-PABA PHL titer on day after C			
			7	10	14	21
At-BGG in	FCA	21	0	2 (3.0)	3 (3.4)	3 (2.8)
	FIA	21	0	2 (2.0)	2 (2.0)	1 (1.0)
	Alum	21	0	0	0	0
	S	21	0	0	0	0
	Alum	21	2 (2.0)	5 (4.6)	5 (4.6)	5 (5.0)
	Alum	42	0	5 (3.2)	5 (4.0)	5 (4.6)
	FIA	42	5 (4.2)	5 (5.4)	5 (6.2)	5 (5.0)
	S	21	0	5 (3.6)	5 (4.6)	5 (5.0)
	PABA-BGG in FIA	.	0	5 (4.0)	5 (5.0)	5 (5.0)
	PABA-BGG in S	21	0	0	0	0

Note; See Table 1.

Table 4. Effect of injection with various hapten-protein conjugates in FCA on anti-PABA production following administration of PABA-BGG in FIA

First injection (F)	Secnod injection (S)	Days between F and S	Anti-PABA PHL titer on day after S				
			0	7	10	14	21
BGG	PABA-BGG	28	0	2 (2.0)	5 (5.0)	5 (6.2)	5 (5.2)
At-BGG			0	5 (3.0)	5 (6.0)	5 (7.0)	5 (7.0)
Sul-BGG <sup>1)</sup>			0	5 (3.2)	5 (6.2)	5 (6.4)	5 (7.0)
DNP-BGG <sup>2)</sup>			0	3 (1.3)	5 (4.2)	5 (5.8)	5 (6.0)
FCA			0	0	5 (3.0)	5 (4.4)	5 (5.0)
.			0	0	3 (2.0)	5 (4.2)	5 (5.2)
PABA-BGG	BGG	42	1 (2.0)	1 (1.0)	0	0	0
	At-BGG		2 (2.0)	5 (3.6)	5 (4.0)	5 (4.0)	5 (3.0)
	Sul-BGG		1 (1.0)	5 (4.0)	5 (4.2)	5 (3.8)	5 (3.0)
	DNP-BGG		2 (1.0)	1 (1.0)	0	0	0

Note: See Table 1 and 2.

1) Sul-BGG: sulfanilic acid azo-BGG

2) DNP-BGG: dinitrophenylated BGG

ここまででえられた成績のうち興味があり重要と思われるものは、BGG in FCA に比し、At-BGG in FCA の前投与が PABA-BGG 投与後の抗 PABA 抗体産生により有効であるということである。そこで At-BGG にかえて Sul-BGG および DNP-BGG を前投与して実験を試みた。なおここで留意すべき点はハプテンと担体の結合様式が At-BGG と Sul-BGG とは同一であるが、At-BGG と DNP-BGG とは異なることである。表 4 にその成績の概要を示した。

これで見ると、PABA-BGG in FIA 追加投与後の抗 PABA 抗体産生の促進増強に対し、Sul-BGG in FCA は At-BGG in FCA とほぼ同程度の前投与効果を示すが、DNP-BGG in FCA は前二者に比べ、その前投与効果は低く、BGG in FCA のそれとほとんど異なるところがなかった。

#### IV B PABA-BGG in FIA 投与後、BGG, At-BGG, Sul-BGG および DNP-BGG in FIA 追加投与動物における抗 PABA 抗体産生について

これまでの実験において、PABA-BGG 追加投与後の抗 PABA 抗体産生に BGG あるいは DNP-BGG に比べ At-BGG あるいは Sul-BGG in FCA の前投与がきわめて効果的であることが実証されたので、ここでは遂に PABA-BGG in FIA 投与後の抗 PABA 抗体産生に及ぼす上記 4 製品追加投与の効果を検討した。表 4 にその成績の概要を示した。

この表からわかるように、PABA-BGG in FIA 投

与 6 週後、抗 PABA 抗体価の低下した時期に At-BGG あるいは Sul-BGG in FCA の投与を行うと明らかな抗 PABA 二次応答がみられたが、BGG あるいは DNP-BGG in FCA 投与ではそのような現象は認められなかった。

#### V A PABA-BGG in FCA 前投与、At-BGG 追加投与動物における抗 At 抗体産生について

これまでの実験成績では、At-BGG in FCA 前投与は、PABA-BGG 追加投与後の抗 PABA 抗体産生に対し明らかに促進増強効果を発揮することを示した。そこでここでは逆に PABA-BGG in FCA 前投与が At-BGG 追加投与後の抗 At 抗体産生に影響するか否かを検討した。表 5 はその成績を要約したものである。

これを一見すると At-BGG in FCA 前処置が PABA-BGG 追加投与後の抗 PABA 抗体産生を促進増強したごとく、PABA-BGG in FCA 前処置もまた At-BGG 追加投与後の抗 At 抗体産生に有効に働くことが明らかに観察された。

#### V B 前投与複合体のハプテンに対する抗体産生への追加投与複合体投与方法の影響

PABA-BGG in FCA 前投与、At-BGG in FIA 追加投与で抗 At 抗体が促進増強されることがこれまでに実証された。そこで逆に上述と同じ抗原の組み合わせで、前投与複合体のハプテンに対する抗体産生が追加投与方法に影響されるか否かについても観察した。

表 5 にその成績を要約した。

Table 5. Effect of supplemental injection of heterologous hapten-homologous carrier conjugate on production of antibody to hapten of priming conjugate

First injection (F)	Second injection (S)	Days between F and S	Anti-PABA PHL titer on day after S					Anti-AT PHL titer on day after S				
			0	7	10	14	21	0	7	10	14	21
PABA-BGG in FCA	AT-BGG in FIA		5 (2.4)	5 (5.2)	5 (4.8)	5 (4.0)	5 (3.5)	0	5 (4.2)	5 (5.4)	5 (5.6)	5 (5.4)
	AT-BGG in S	42	5 (2.8)	5 (2.4)	5 (2.4)	5 (2.0)	3 (1.0)	0	0	3 (2.0)	3 (2.0)	2 (1.0)
	PABA-BGG in S		5 (2.2)	5 (4.6)	5 (5.4)	5 (5.0)	5 (5.0)	0	0	0	0	0
	AT-BGG in FIA	•	0	0	0	0	0	0	0	5 (5.0)	5 (5.4)	5 (6.0)
AT-BGG in FCA	PABA-BGG in FIA		0	5 (4.2)	5 (5.4)	5 (6.0)	5 (5.6)	3 (2.3)	5 (5.0)	5 (4.8)	5 (4.6)	5 (4.0)
	PABA-BGG in S	42	0	0	3 (2.3)	3 (2.0)	3 (1.7)	3 (3.0)	3 (2.0)	3 (2.0)	3 (2.0)	3 (1.7)
	AT-BGG in S		0	0	0	0	0	4 (2.0)	5 (4.2)	5 (5.2)	5 (5.0)	5 (4.6)
	PABA-BGG in FIA	•	0	0	5 (4.2)	5 (5.0)	5 (5.0)	0	0	0	0	0

Note: See Table 1 and 2.

これによると PABA-BGG in FCA および At-BGG in FCA 前投与群にそれぞれ At-BGG in FIA および PABA-BGG in FIA を追加投与すると、それぞれ二次抗 PABA および二次抗 At 抗体応答がみられた。しかし追加投与にそれぞれ At-BGG in S および PABA-BGG in S を用いるとそれぞれ抗 PABA および抗 At 抗体応答を促進増強する知見はえられなかった。これは PABA-BGG in FCA 前投与 PABA-BGG in S 追加投与および At-BGG in FCA 前投与 At-BGG in S 追加投与でみられるそれぞれの二次抗ハプテン抗体応答との間に顕著な対比を示している。この点はまた、表 3 で見られた At-BGG in S 前投与、PABA-BGG in FIA 追加投与動物において、抗 PABA 産生の促進増強のみられない所見、ならびに表は省略するけども At-BGG in S 前投与 At-BGG in FIA 追加投与によって二次的抗 At 応答のみられる知見を併せ考えると、興味のあるところである。

#### VI 抗ハプテン産生における PABA-BGG と DNP-BGG 間の相互関係

表 4 においてみられたごとく DNP-BGG in FCA 投与は PABA-BGG in FIA 投与の前あるいは後のいずれの時期に行なわれてもきわめて低い抗 PABA 抗体産生増強効果を示すのみである。ここではその点を再確認するとともに PABA-BGG in FIA 投与が DNP-BGG in FCA 投与後の抗 DNP 抗体産生に影響するか否かの検討を試みた。表 6 はその成績を示したものである。

ここで、DNP-BGG in FCA 投与は PABA-BGG 投与の前あるいは後の時期に行なわれても、抗 PABA 抗体産生促進増強効果を発揮しないことが再確認されると同時に PABA-BGG in FIA 投与も抗 DNP 抗体産生にほとんど影響を及ぼさないことが実証された。これらの所見は表 5 でみられた At-BGG と PABA-BGG

間関係と著しく異なるところである。

#### VII OA-BGG あるいは An-BGG 投与の PABA-BGG 追加投与後の抗 PABA 抗体産生への影響

ハプテンと担体の結合様式が、At-BGG, Sul-BGG, および PABA-BGG と同一である OA-BGG あるいは An-BGG を用い、その FCA 法での前投与が PABA-BGG 追加投与後の抗 PABA 抗体産生に効果的であるか否かを検討した。表 7 a はその成績を示したものである。

これとみると、OA-BGG および An-BGG in FCA 投与には BGG in FCA 投与と同じく、PABA-BGG in S 追加投与後の抗 PABA 抗体産生促進効果が認められない。しかしながら PABA-BGG in FIA 追加投与後の抗 PABA 抗体産生は BGG in FCA 前投与によって促進増強されているが前二者の前投与にはそのような効果を認めがたい。

At-BGG, PABA-BGG および Sul-BGG には相互間に BGG には認められない抗ハプテン抗体産生促進増強作用があることに、ハプテンと BGG の同一結合様式に一因があるかもしれないとして行った本実験において、そのような推論を実証することは全くできなかった。

また、ここで PABA-BGG in FCA 投与動物において、OA-BGG と At-BGG または PABA-BGG との皮膚反応性を比較してみた。表 7 b はその成績を示したものである。

これとみると、BGG 脱感作あるいは OA-BGG 脱感作後は抗 BGG および抗 OA-BGG DHS はともにみられなくなるが、At-BGG および PABA-BGG による DHS はなお残存が認められ、At-BGG 脱感作後は抗 PABA-BGG DHS のみしか残存しないこと、興味ある差異を示した。担体と結合部を抗原とした DHS が存在

Table 6. Effect of injection with PABA-BGG in FIA on anti-DNP production following administration of DNP-BGG in FCA

First injection (F)	Second injection (S)	Days between F and S	Anti-PABA PHL titer on day after S					Anti-DNP PHL titer on day after S				
			0	7	10	14	21	0	7	10	14	21
PABA-BGG	DNP-BGG	42	4 (3.0)	4 (2.4)	4 (2.4)	4 (2.0)	4 (2.0)	0	3 (4.8)	5 (7.4)	5 (8.0)	5 (8.0)
•	DNP-BGG	•	0	0	0	0	0	0	5 (5.0)	5 (7.0)	5 (8.0)	5 (8.2)
DNP-BGG	PABA-BGG	42	0	2 (1.0)	5 (3.0)	5 (3.4)	5 (3.4)	5 (8.0)	5 (8.0)	5 (7.8)	5 (7.2)	5 (7.2)
•	PABA-BGG	•	0	0	5 (3.6)	5 (4.0)	5 (4.2)	0	0	0	0	0

Note: See Table 1 and 4.

するとすれば OA-BGG 脱感作後, 抗 At-BGG DHS の消失が認められるかもしれないとして行った本実験で, そのような知見はえられなかった。

#### VIII 抗ハプテン抗体産生と DHS 発現の関係

FCA 法以外での抗原投与はその後の FCA 法による同一抗原投与後の DHS 発現を抑制することはあるが必ずしも抗体産生を低下させないことが報告されており, この現象は Immune deviation と呼ばれている。<sup>6), 10-13)</sup> ここでは BGG, At-BGG あるいは PABA-BGG in FIA の前投与と PABA-BGG in FCA 追加投与後の抗 PABA 抗体産生あるいは BGG, PABA-BGG に対する DHS 発現との関連性について検索を試みた。表 8 はそ

の成績を示したものである。

これで見ると, 抗 BGG DHS の発現は, いずれの前投与によっても抑制されているが, 抗 PABA-BGG DHS の発現は PABA-BGG の前投与によってのみ強く抑制されていて, BGG あるいは At-BGG の前投与ではほとんど抑制が認められない。

一方抗 PABA 抗体の産生は BGG 前投与群では影響されないが, At-BGG 前投与群では促進増強され, PABA-BGG 前投与群では完全な二次応答が観察された。

以上の成績は抗 BGG あるいは抗 PABA-BGG DHS の発現と抗 PABA 抗体産生との間の並行関係を否定

Table 7a. Effect of pretreatment with OA-BGG in FCA on production of anti-PABA antibody following administration of PABA-BGG.

First injection (F)		Second injection (S)	Days between F and S	Anti-PABA PHL titer on day after S				
				0	7	10	14	21
OA-BGG <sup>1)</sup>	in FCA	PABA-BGG in S	28	0	0	0	0	0
An-BGG <sup>2)</sup>				0	0	0	0	0
OA-BGG	in FCA	PABA-BGG in FIA	42	0	0	5 (2.0)	5 (3.8)	5 (5.2)
An-BGG				0	0	5 (1.6)	5 (3.4)	5 (4.8)
.		PABA-BGG in FIA	.	0	0	3 (2.0)	5 (4.0)	5 (5.0)

Note: See Table 1. 1) OA-BGG; o-Aminophenol azo-BGG 2) An-BGG; Aniline azo-BGG.

Table 7b. Effect of desensitization with BGG, At-BGG, OA-BGG and PABA-BGG on development of DHS-skin reaction in animals sensitized with PABA-BGG.

Sensitization	Desensitization	DHS-skin reaction to			
		BGG	At-BGG	OA-BGG	PABA-BGG
	.	5 (2.5)	5 (2.6)	5 (1.8)	5 (2.8)
	BGG	0	5 (2.0)	0	5 (2.4)
PABA-BGG	At-BGG	0	0	0	5 (1.6)
	OA-BGG	1 (0.5)	5 (1.6)	0	5 (2.0)
	PABA-BGG	0	0	0	2 (0.5)

Note: Skin test was carried out 8 days after the sensitization. Desensitization was performed by two intraperitoneal injections of 25 mg of antigen at 0 and 2 hours before skin testing.



Table 8. Effect of suppression of DHS on antibody response and migration of peritoneal cells

First injection (F)	Second injection (S)	Days between F and S	Anti-PABA PHL titer on day after S					DHS on day 7 after S		MI <sup>1)</sup> -index on day 14 after S			
			5	7	10	14	21	BGG	PABA-BGG	BGG	PABA-BGG	PF <sup>2)</sup>	HEA
BGG in FIA			0	0	5 (3.0)	5 (3.6)	5 (4.8)	3 (0.5)	5 (2.0)	0.86	0.82	0.50	1.02
AT-BGG in FIA	PABA-BGG in FCA	42	0	3 (2.0)	5 (4.2)	5 (5.0)	5 (6.0)	5 (0.5)	5 (2.0)	0.84	0.88	0.62	•
PABA-BGG in FIA			5 (4.0)	5 (6.0)	5 (6.8)	5 (7.0)	5 (7.0)	1 (0.5)	1 (2.0)	0.95	0.78	0.58	•
	PABA-BGG in FCA		0	0	5 (3.2)	5 (4.0)	5 (5.2)	5 (1.8)	5 (2.4)	0.80	0.78	0.48	0.98

Note: See Table 1.

1) MI: Migration inhibition

2) PF: Tuberculo-protein

3) HEA: Hen egg albumin

するものであって、少なくとも DHS の発現低下は—effector T cell の活性低下またはその数の減少あるいは suppressor T cell の活性上昇またはその数の増加によるかは問わないが—helper T cell には無関係であることを示唆していると思われる。

ちなみに、DHS 発現と腹腔細胞の遊走阻止 (MI) との関連性についてみた成績も表 8 に示した。これで見ると BGG あるいは PABA-BGG による MI と DHS の発現が同じ T cell と抗原の相互作用に由来するものであっても並行関係があるとは認められず、それぞれのその他の関与条件 (因子) の複雑さを窺わせるものである。

## 考 察

ハプテン担体複合体免疫動物に二次抗ハプテン抗体応答を惹起させるには同一複合体の投与が効果的であって、ハプテンは同一でも担体の異なる複合体の投与には一般的にはそのような効果のないことは多くの研究者<sup>14)~17)</sup>の指摘しているところである。

一方 Rajewsky ら<sup>18)</sup>や Mitchison ら<sup>19)</sup>は抗ハプテン産生には 2 種の細胞、あるいは T 細胞と B 細胞の協力が必要であることを観察し、Katz ら<sup>2)</sup>は複合体食塩水法投与に先行した同一担体の FCA 法投与、または同一ハプテンで異なる担体の 2 種複合体の食塩水法投与の中間の時期に後投与複合体と同一の担体の FCA 法投与によって、それぞれ一次および二次抗ハプテン抗体応答の増進がみられること、更に Klinman<sup>20)</sup>も担体免疫動物に複合体免疫動物の脾細胞移行実験を行い、複合体投与による抗ハプテン産生に同一担体の前投与が重要な役割りを演じていること、などを報告したのに端を発し、この方面の研究は一大進展を遂げ、その知

見は飛躍的に増大し、抗ハプテン抗体応答における担体効果が脚光を浴びるに至り、その機序についても漸次解明されつゝあることは周知のところである。

ところでモルモットに hapten-protein conjugate in S を投与すると抗ハプテン 19 S および 7 S<sub>1</sub> 抗体、conjugate in adjuvant (Alum, FIA, FCA) の投与によっては更に 7 S<sub>2</sub> 抗体の産生のみられることはすでに報告されており、<sup>8), 21)</sup>著者もこれを確認した。そこで著者は抗原の食塩水法投与と adjuvant 法投与とでみられる著明な差異、すなわち 7 S<sub>2</sub> 抗体—溶血活性—産生を指標として担体効果の周辺について検索の歩を進めた。

さて Katz ら<sup>2)</sup>は定量沈降法あるいは受身血球凝集反応によって抗体を測定し、hapten-carrier in S 投与前の carrier in FCA 投与は一次抗ハプテン応答を増進させるとしているが、こゝでは受身溶血反応による検討で異なる成績がえられた。すなわち、BGG in FCA 前投与 PABA-BGG in S 追加投与群でみられる抗 PABA 産生は、FCA 前処置、PABA-BGG in S 投与群のそれと異なるところがなく、担体効果があるとはみられない。しかし BGG in FCA 処置後 PABA-BGG in FIA を投与すると PABA-BGG in FIA 単独投与に比し抗 PABA 産生はかなり促進増強され BGG in FCA 前処置の効果は明らかであって、いわゆる担体効果が認められる。

興味もあり重要と思われるのは、前処置に BGG in FCA のかわりに At-BGG in FCA を用いた時にえられた知見である。すなわち、At-BGG in FCA 前処置では PABA-BGG in FIA 投与後はいうまでもなく、PABA-BGG in S 投与後も抗 PABA 産生の促進増強が認められる。このことは、担体のみよりも二次投与複合体とはハプテンが異なっても同一担体である複合

体の一次投与によって二次投与複合体のハプテンに対する抗体産生が促進増強されることを示している。

さて、At-BGG in FIA 前投与が PABA-BGG in S 追加投与後の抗 PABA 産生に効果的であることがわかったので、更に At-BGG 前投与の方法をかえて観察した。それで見ると、At-BGG in FIA には強い前投与効果が認められるが、At-BGG in S には認められなかった。

一方、At-BGG 以外の前処置の影響をみるために、Sul-BGG あるいは DNP-BGG in FCA で前処置し PABA-BGG in FIA を追加投与した。その結果、明らかに Sul-BGG にも At-BGG と同様前処置効果が認められたが、DNP-BGG にはほぼ BGG と同様程度の効果しかないことが観察された。

ところで、これまでは追加投与複合体のハプテンに対する抗体産生に及ぼす各種前処置の影響をみたのであるが、次いで逆に前投与複合体のハプテンに対する抗体産生への各種追加投与の影響を検討した。すなわち PABA-BGG in FIA 投与後、At-BGG, Sul-BGG あるいは DNP-BGG in FCA を追加投与したところ前二者の追加投与は明らかに二次抗 PABA 応答を惹起させたが、後者にはその作用が認められなかった。

更に PABA-BGG in FIA が At-BGG あるいは DNP-BGG in FCA 投与後のそれぞれ抗 At あるいは抗 DNP 産生に効果的であるかをみたところ PABA-BGG in FIA は At-BGG in FCA 処置の前あるいは後に投与されても、ともに抗 At 産生の増進をもたらしたが、DNP-BGG in FCA 処置後の抗 DNP 産生には影響を与えなかった。

ところで、インフルエンザウイルスを用いて original antigenic sin という現象が Francis<sup>22)</sup>によって報告されているが、このことは交叉反応性抗原で続いて免疫されると一次抗原に対する応答が二次抗原投与後顕著に惹起されるという現象にまで普遍化されている。例えば Deutsch ら<sup>23)</sup>は m-aminobenzoic acid と m-sulfanilic acid 間においてこの現象を認めている。また Fazekas ら<sup>24)</sup>によると、初回注射によって各種特異性のクローンの増殖が促がされ、その中に交叉反応原に対する抗体産生クローンが含まれており、これが交叉反応原の追加投与によって刺激され増殖分化することにより生ずる現象として original antigenic sin が理解されようとしている。換言すればこの現象は基本的には一種の既往性反応であるとしている。また一方 Klinman ら<sup>25)</sup>はこのような現象は二次 B 細胞が交叉抗原によく反応することによるのであろうとしている。

さて、今回著者が用いた PABA-BGG, At-BGG および Sul-BGG 間には相互に抗ハプテン産生を促進増強さ

せる活性のあることは確かであるが、PABA, At および Sul 間に交叉反応性があるか否かは早急には断言しえない。少なくとも PABA-BGG, At-BGG および Sul-BGG で作製した免疫血清については PHL 法で検討してハプテン間に交叉反応性があると認められる所見はえられなかった。

一方これらの 3 複合体は担体が同一であり、ハプテンと担体の結合方式も同一である。このことが相互の抗ハプテン産生への協力効果の一因であるかもしれないとする推定にも捨てがたいものがある。すなわち Eisen ら<sup>26)</sup>, Stahmann ら<sup>27)</sup> および Henny ら<sup>28)</sup>は hapten-protein in conjugate において、ハプテンおよび担体のほか、結合部にも抗原性を認めているが、福井<sup>29)</sup>は複合体には複合体全体および担体のほか、結合部を含む担体部に DHS 反応惹起原性のあることを実証しており、担体単独よりも結合部を含めた担体を認識する helper T cell が存在し抗ハプテン産生に効率的に作用する可能性を否定しえない。そこで、PABA-BGG, At-BGG および Sul-BGG などと担体と結合形式が同一である OA-BGG または An-BGG の前投与が、それぞれ PABA-BGG 追加投与後の抗 PABA 産生に効果があるか否かを検索した。その結果 OA-BGG および An-BGG にはともに前投与効果が全く認められなかった、このことは単に担体および結合形式が同一であることのみが、PABA-BGG, At-BGG および Sul-BGG 間の相互の抗ハプテン産生効果の原因でないことを示しているかもしれない。しかし An-BGG あるいは OA-BGG 前投与が BGG 前投与よりも非効果的である知見からみて、Straubauch ら<sup>17)</sup>のいうように複合体作製条件を異にするため、OA-BGG, An-BGG, PABA-BGG, At-BGG および Sul-BGG において前二者は後三者と結合形式は同一であっても担体に差が生じて前投与効果を発揮できなくなった可能性も否定できない。更に検討を要するところである。

さて PABA-BGG, At-BGG および Sul-BGG には相互に抗ハプテン抗体応答を増進させる効果のあることは観察されたが、それがどのような因子によって惹起されるのかは明らかにすることができなかった。しかし一連の実験のなかでえられた興味もあり重要と思われる知見の一つは免疫方法によっては効果の発現されない場合があるということである。すなわち PABA-BGG in FIA 投与後の抗 PABA 抗体応答に At-BGG in S の前投与および追加投与はともに影響がなく、At-BGG in FIA の前および追加投与は促進増強効果を有すること、At-BGG in FIA 前投与、PABA-BGG in S 追加投与では抗 PABA 産生の増進がみられるが、二次抗 At 抗体応答は惹起されないなどの知見である。このこ

とは PABA-BGG in S は PABA-BGG in FIA 投与の前後いかなる時期に投与されても二次抗 PABA 応答が惹起されること、顕著な対比を示している。これらの知見は PABA-BGG と At-BGG 間の相互の抗ハプテン抗体産生増進活性を考える上できわめて重要であって、この活性はハプテンあるいは複合体のその他のいかなる部分の交叉原性またはどのような機能に由来するにしても conjugate in S 投与では顕在化されず、その顕在化には adjuvant の存在が必要であると思われる。それによって helper T cell と B cell, あるいは Ha<sup>30)</sup>, Tada<sup>31)</sup> または Taniguchi<sup>32)</sup>らの報告から推定されるように helper T cell と suppressor T cell が抗ハプテン産生への効率的な相互関係へ導かれるのではないかと考えられ、その間の関係の検討は今後の課題である。

### 結 論

担体を同じくするハプテン担体複合体—p-Aminobenzoic acid azo-BGG (PABA-BGG), Atoxyl azo-BGG (At-BGG), Sulfanilic acid azo-BGG (Sul-BGG), o-Aminophenol azo-BGG (OA-BGG), Aniline azo-BGG (An-BGG) および Dinitrophenylated BGG (DNP-BGG)—相互間の抗ハプテン抗体産生に及ぼす影響について検討し、次の成績をえた。

1. PABA-BGG 投与後の抗 PABA 抗体応答は BGG in FCA 前投与に比し、At-BGG in FCA の前投与によって著しく促進増強された。

At-BGG のこのような前投与効果は FCA 法投与で最も強く、FIA 法投与、Alum 沈降法投与の順に弱くなった。At-BGG in S には全く前投与効果が認められなかった。

2. PABA-BGG in FCA 投与、At-BGG in FIA 追加投与および PABA-BGG in FIA 投与、At-BGG in FCA 追加投与によっていずれも抗 PABA 既往性反応の惹起が認められた。BGG in FCA または At-BGG in S の追加投与ではこのような現象は認められなかった。

3. At-BGG in FCA 投与後、PABA-BGG in FIA 追加投与は抗 At 既往性反応を惹起させた。PABA-BGG in S 追加投与にはこのような効果は認められなかった。

4. PABA-BGG 投与後の抗 PABA 抗体応答に對し、Sul-BGG は At-BGG とほぼ同一効果を示した。

5. OA-BGG および An-BGG 前投与はいずれも PABA-BGG 投与後の抗 PABA 抗体応答に影響を与えなかった。

6. DNP-BGG および PABA-BGG には相互にそれ

ぞれ抗 PABA および抗 DNP 抗体産生を促進増強させる作用を認めなかった。

### 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜った高橋守信教授、西東利男教授（現、金沢医科大学教授）に感謝の意を表します。また、実験の遂行にあたり多大な御協力を戴きました教室員各位に感謝の意を表します。

### 文 献

- 1) Katz, D. H., Paul, W. E., Goidl, E. A. and Benacerraf, B.: Carrier Function in Anti-Hapten Immune Responses-Enhancement of Primary and Secondary Anti-Hapten Antibody Responses by Carrier Preimmunization. *J. Exp. Med.*, **132**, 261-282 (1970)
- 2) Paul, W. E., Katz, D. H., Goidl, E. A. and Benacerraf, B.: Carrier Function in Anti-Hapten Immune Responses-Specific Properties of Carrier Cells Capable of Enhancing Anti-Hapten Antibody Responses. *J. Exp. Med.*, **132**, 283-299 (1970)
- 3) 立村森男：抗ハプテン抗体産生に関する研究—各種前投与の影響について—；金沢医理学叢書 95, 71-82 (1974)
- 4) Eisen, H. N., Belman, S. and Casten, M. E.: The Reaction of 2, 4-Dinitrosulfonic Acid with Free Aminogroups of Proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 4583-4585 (1953)
- 5) 越沢みち子, 佐々木 静, 鷹西道雄, 佐藤次郎：遅発型皮膚反応の発現機序に関する研究—Alum および Bordetella pertussis の Adjuvant 効果の検討—金大結研年報 **24**, 39-43 (1966)
- 6) 越沢みち子：遅発型皮膚反応の発現機序に関する研究—抗原前処置部位と遅発型皮膚反応発現の抑制—金大がん研年報 **2**, 75-86 (1968)
- 7) Raffel, S., Arnold, L. E., Dukes, C. D. and Huany, J. S.: The Role of the Wax of the Tubercle Bacillus in Establishing Delayed Hypersensitivity-II Hypersensitivity to a Protein Antigen, Egg Albumin. *J. Exp. Med.*, **90**, 53-71 (1949)
- 8) 山端輝夫：遅発型皮膚反応の発現機序に関する研究—遅発型皮膚反応発現の特異的抑制と体液性抗体産生—金沢医理学叢書 **88**, 71-80 (1971)
- 9) George, M. and Vaughan, J. H.: In vitro cell migration as a model for delayed hypersensitivity, *Pro. Soc. Exp. Bio. Med.*, **111**, 514-521 (1962)
- 10) Asherson, G. L. and Stone, S. H.: Selective

and specific inhibition of 24-hour skin reactions in the guinea-pig. I, Immune deviation: Descriptions of the effect of splenectomy. *Immunol.*, **9**, 205-217 (1965)

11) Asherson, G. L.: Selective and specific inhibition of 24-hour skin reactions in the guinea-pig. II, The mechanism of immune deviation. *Immunol.*, **10**, 179-186 (1966).

12) Loewi, G., Holbolow, E. J. and Temple, A.: Inhibition of delayed hypersensitivity by preimmunization without complete adjuvant. *Immunol.*, **10**, 339-347, (1966).

13) Dvorak, H. F. Billote, J. B., MacCarthy, J. S. and Flax, M. H.: Immunologic unresponsiveness in the adult guinea-pig: suppression of delayed hypersensitivity and antibody formation to protein antigens. *J. Immunol.*, **94**, 966-975, (1965).

14) Ovary, Z. and Benacerraf, B.: Immunological specificity of the secondary response with dinitrophenylated proteins. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.*, **114**, 72-76, (1963).

15) Rajewsky, K., Roelants, G. E. and Askonas, B. A.: Carrier specificity and allogeneic effect in mice. *Eur. J. Immunol.*, **2**, 592-598, (1972).

16) Siskind, G. W. and Benacerraf, B.: Cell selection by antigen in the immune response. *Adv. Immunol.*, **10**, 1-50, (1969).

17) Straubach, P. H., Tarrab, B., Silica, A. and Sela, M.: Properties of guinea pig 7S antibodies. *J. Immunology*, **108**, 236-245, (1972).

18) Rajewsky, K., Schirmmachten, V., Nase, S. and Jerne, N. K.: The requirement of more than one antigenic determinant for immunogenicity. *J. Exp. Med.*, **129**, 1131-1141, (1969).

19) Mitchison, N. A.: The carrier effect in the secondary response to hapten protein conjugates: Measurement of the effect with transferred cells and objections to the local environment hypothesis - Cellular co-operation. *Eur. J. Immunol.*, **107**, 18-27, (1971).

20) Klinman, N. R.: The mechanism of antigenic stimulation of primary and secondary clone precursor cells. *J. Exp. Med.*, **136**, 241-260, (1972).

21) Benacerraf, B. Ovary, Z., Block, K. J. and Franklin, E. C.: Properties of guinea pig 7S

antibodies-electrophoretic separation of two types of guinea pig 7S antibodies. *J. Exp. Med.*, **117**, 937-949, (1963).

22) Francis, T. Influenza: The New Acquaintance.: *Ann. Inter. Med.*, **39**, 203-221, (1953).

23) Deutsch, S. and Bussard, A. E.: Original antigenic sin at the cellular level-antibodies produced by individual cells against cross-reacting haptens. *Eur. J. Immunol.*, **2**, 374-378, (1972).

24) Fazekas de st. G. S. and Webster, R. G.: Disquisition on original antigenic sin-evidence in man. *J. Exp. Med.*, **124**, 331-345, -Proof in lower creatures- 347-361, (1966).

25) Klinman, N. R., Press, J. L. and Segal, G. P.: Overlap stimulation and secondary stimulation of primary and secondary B cells by cross-reacting determinant. *J. Exp. Med.*, **138**, 1276-1281, (1973).

26) Eisen, H. N., Carsten, M. E. and Belman, S.: Studies of hypersensitivity to low molecular weight substances-the 2, 4-dinitrophenyl group as a determinant in the precipitation reaction. *J. Immunol.*, **73**, 291-308, (1954).

27) Stahmann, M. A., Lapresle, C., Buchanan-Davidson, D. J. and Grabar, P.: Immunochemistry of synthetic polypeptides and polypeptidyl proteins: Quantitative studies on the modified proteins. *J. Immunol.*, **83**, 534-542, (1959).

28) Henny, C. S.: The specificity of the early immune response to dinitrophenylated human  $\gamma$ G-globulin. *Immunochemistry*, **7**, 275-287, (1970).

29) 福井 啓: ハプテン蛋白複合体の免疫原性に関する研究—遅延型過敏症発現能について—, 十全医学誌 **85**, 374-381, (1976)

30) Ha, T. Y. and Waksman, B. H.: Role of the thymus in tolerance—"Suppressor" activity of antigen stimulated rat thymocytes transferred to normal recipient. *J. Immunol.*, **110**, 1290-1299, (1973).

31) Tada, T. and Takemori, T.: Selective roles of thymus derived lymphocytes in the antibody response-differential suppressive effect of carrier-primed T cell on hapten-specific IgM and IgG antibody response. *J. Exp. Med.*, **140**, 239-252, (1974).

32) Taniguchi, M., Tada, T. and Tokuhisa, T.:

Properties of the antigen specific suppressive T-cell factor in the regulation of antibody response of the mouse-dual gene control of the T-cell-mediated

suppression of the antibody response. J. Exp. Med., 144, 20-31, (1976).

**Effect of Treatment with Hapten-Carrier Conjugate on the Production of Antibody to Different Hapten Coupled to the Same Carrier** Fuminao Yoshida, Department of Immunobiology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa, 920 — J. Juzen Med. Soc., 90, 637–650 (1981)

**Key words:** carrier effect, 7S $\gamma_2$  antibody, p-aminobenzoic acid azo-BGG, atoxyl azo-BGG, sulfanilic acid azo-BGG

#### Abstract

Preimmunization of guinea pigs with bovine  $\gamma$ G(BGG) in Freund's complete adjuvant(FCA) prepares the animals for enhanced anti-PABA 7S $\gamma_2$  antibody(anti-PABA) response to PABA azo-BGG(PABA-BGG) in Freund's incomplete adjuvant(FIA), but not to PABA-BGG in saline. When BGG is replaced by atoxyl azo-BGG(At-BGG), marked enhancement of anti-PABA response is observable following injection of PABA-BGG either in FIA or in saline. Preimmunization with At-BGG in FIA in place of At-BGG in FCA is also effective on enhancing anti-PABA response to PABA-BGG either in FIA or in saline, whereas preimmunization with BGG in FIA shows no enhancing effect on the production of anti-PABA against PABA-BGG in FCA and preimmunization with At-BGG in saline is ineffective on enhancing anti-PABA response to PABA-BGG in FIA. Immunization with At-BGG in Freund's adjuvant(FA) causes secondary anti-PABA response in animals pretreated with PABA-BGG in FA, and vice versa. Sulfanilic acid (Sul) azo-BGG used as preimmunizing antigen is as effective as At-BGG on enhancing anti-PABA response to PABA-BGG. Also, pretreatment with PABA-BGG is effective on enhancing anti-At response to At-BGG. Pretreatment with o-aminophenol azo-BGG, however, is not effective on enhancing anti-PABA response to PABA-BGG in FCA. No cross reactions are demonstrated among PABA, At and Sul as measured by passive hemolysis technic. Additional experiments disclose that decreased development of delayed hypersensitivity-skin reaction to BGG or PABA-BGG has no influence on producing anti-PABA and on macrophage migration inhibition.